

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

Los eritrocitos nucleados de peces en la inmunización frente a rhabdovirus

Sara Puente Marín

Directores:

Dra. María del Mar Ortega-Villaizán Romo

Dr. Julio Coll Morales

Defendida el 26 de julio de 2019 en la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH)

Realizada en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE – UMH)

Mención *cum laude*

Resumen

El sector de la acuicultura es catalogado como uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento. La intensa acuicultura desarrollada en los últimos años, favorece la susceptibilidad a patógenos. Entre los patógenos que causan importantes pérdidas en acuicultura se encuentran los virus de la familia *Rhabdoviridae*. Debido a su impacto económico, estos virus y sus hospedadores han sido ampliamente estudiados con el fin de desarrollar medidas profilácticas frente a las infecciones virales. Entre estas medidas, la vacunación ha resultado la más efectiva y las vacunas DNA, desarrolladas en los últimos años, las más prometedoras en acuicultura. Sin embargo, la extrapolación de las vacunas DNA efectivas frente a algunos virus a otros virus patógenos ha resultado insatisfactoria. Las razones del porqué las vacunas DNA no son eficaces frente a algunos virus se desconoce. Por tanto, es necesaria más información acerca de la funcionalidad del sistema inmune de los peces, la inmunidad desarrollada por las vacunas DNA, por los virus y sus antígenos y comprender las interacciones patógeno-hospedador para desarrollar vacunas DNA más efectivas en acuicultura.

En este contexto, aparecen los eritrocitos (RBCs, del inglés "Red blood cells") de peces. Estas células nucleadas características de vertebrados no mamíferos han sido poco investigadas ya que hasta hace poco se creía que su función era meramente el transporte de oxígeno en el organismo. En la última década se ha descrito que los RBCs nucleados son capaces de internalizar patógenos y liberar citoquinas frente a estímulos, otorgándoles otras funciones, hasta hace poco desconocidas, postulándose así como células con características inmunes. Sin embargo, todavía se desconoce su papel y participación en el sistema inmunitario de los peces.

En esta tesis, pretendemos dilucidar el papel de los RBCs en la inmunización de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con una vacuna DNA frente a un rhabdovirus, el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), y su posible utilización en el diseño de estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas eficaces frente a rhabdovirus.

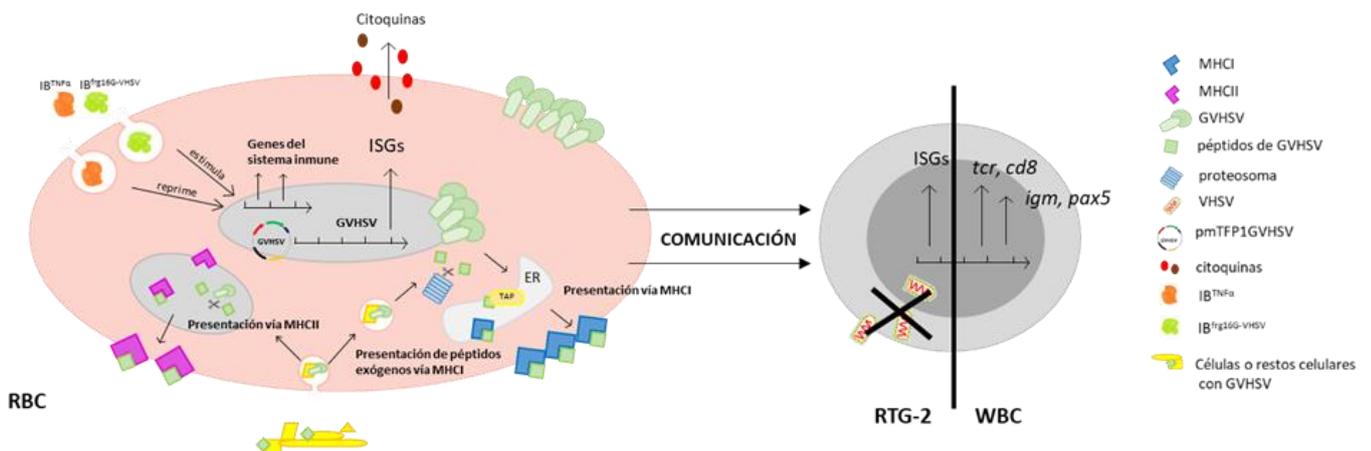
Con ese fin, analizamos la respuesta inmune de los RBCs de trucha arcoíris transfectados con una vacuna DNA que codifica el gen de la glicoproteína G de VHSV (GVHSV), así como de RBCs tras la inmunización de trucha arcoíris con esta vacuna DNA. Durante el desarrollo de esta tesis se puso a punto el método de purificación de los RBCs mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Analizamos el perfil de transcriptómica de RBCs creando una base de datos específica y/o enriquecida para RBCs (disponible en un repositorio de libre acceso), mediante el ensamblaje *de novo* de las secuencias obtenidas en la secuenciación del RNA. Además, se publicó por primera vez la secuenciación del proteoma de RBCs nucleados, para el que diseñamos un método de fraccionamiento de membrana y citosol, depleción de la hemoglobina y fraccionamiento peptídico, para la cuantificación de cada fracción por separado.

Nuestros resultados mostraron que los RBCs nucleados de peces son capaces de expresar un antígeno codificado por una vacuna DNA, en nuestro caso la proteína GVHSV. Los RBCs de trucha arcoíris sobreexpresan genes y proteínas inducidos por interferón, relacionados con la presentación de antígenos y detoxificación de especies reactivas de oxígeno, así como de señalización celular cuando son transfectados con GVHSV. También mostramos como estos RBCs transfectados protegen frente a la infección por VHSV y estimulan genes relacionados con interferón en la línea celular RTG-2 además de inducir marcadores de diferenciación en leucocitos.

Por otro lado, en ensayos *in vivo*, identificamos en RBCs de individuos inmunizados con GVHSV, mediante transcriptómica y proteómica, rutas de respuesta a estrés celular, presentación de péptidos exógenos, regulación de la hemopoyesis y regulación y señalización a leucocitos. También evaluamos la capacidad de los RBCs de inducir una respuesta humoral en el organismo. Llevamos a cabo la transfusión de RBCs autólogos transfectados con GVHSV en individuos de trucha arcoíris. Tras 30 días, detectamos anticuerpos específicos anti-VHSV en el suero de los individuos inyectados. Nuestros resultados demuestran que RBCs nucleados portadores de la vacuna son capaces de generar una respuesta humoral en el organismo tan efectiva como la administración de la vacuna por vía intramuscular.

Finalmente, el estudio se extendió a la evaluación de la respuesta inmune de los RBCs a las vacunas basadas en proteínas recombinantes. Los RBCs de trucha arcoíris endocitan cuerpos de inclusión bacterianos hechos de proteínas recombinantes y modulan su expresión génica en función de la proteína recombinante.

Los resultados de esta tesis muestran cómo los RBCs participan en la respuesta innata y adaptativa en la inmunización con una vacuna DNA y abren una nueva dirección en la búsqueda de nuevas estrategias de vacunación en acuicultura.



Palabras clave: RBCs, eritrocitos, vacunas DNA, respuesta inmune.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/11000/5464>

- Puente-Marin, S., Nombela, I., Chico, V., Ciordia, S., Mena, M. C., Coll, J., Ortega-Villaizan, M. D. M. (2019). Potential Role of Rainbow Trout Erythrocytes as Mediators in the Immune Response Induced by a DNA Vaccine in Fish. *Vaccines*, 7(3): 60. DOI: 10.3390/vaccines7030060
- Puente-Marin, S., Thwaite, R., Mercado, L., Coll, J., Roher, N., Ortega-Villaizan, M. D. M. (2019). Fish red blood cells modulate immune genes in response to bacterial inclusion bodies made of TNF α and a G-VHSV fragment. *Front. Immunol.*, 10: 1055. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01055
- Puente-Marin, S., Nombela, I., Ciordia, S., Mena, M. C., Chico, V., Coll, J., Ortega-Villaizan, M. D. M. (2018). *In silico* Functional Networks Identified in Fish Nucleated Red Blood Cells by Means of Transcriptomic and Proteomic Profiling. *Genes*, 9: 202. DOI: 10.3390/genes9040202
- Puente-Marin, S., Nombela, I., Chico, V., Ciordia, S., Mena, M. C., Coll, J., Mercado, L., Ortega-Villaizan, M. D. M. (2018). Rainbow Trout Erythrocytes *ex vivo* Transfection With a DNA Vaccine Encoding VHSV Glycoprotein G Induces an Antiviral Immune Response. *Front. Immunol.*, 9: 2477. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02477